

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

4

28.04.00

26 JUN 2000

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 1999年 4月30日

出願番号
Application Number: 平成11年特許願第123561号

出願人
Applicant(s): 宮田 敏男
黒川 清

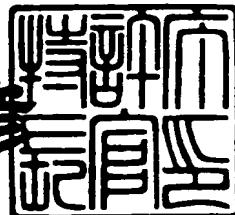
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月 9日

特許長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3042340

【書類名】 特許願
【整理番号】 KRK-103
【提出日】 平成11年 4月30日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/12
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県伊勢原市東成瀬4-2-3-101
【氏名】 宮田 敏男
【特許出願人】
【識別番号】 597142376
【氏名又は名称】 宮田 敏男
【特許出願人】
【識別番号】 597142387
【氏名又は名称】 黒川 清
【代理人】
【識別番号】 100102978
【弁理士】
【氏名又は名称】 清水 初志
【選任した代理人】
【識別番号】 100108774
【弁理士】
【氏名又は名称】 橋本 一憲
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 041092
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 メグー3タンパク質

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：2に記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、このアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項2】 配列番号：2のアミノ酸配列を含む請求項1のタンパク質。

【請求項3】 請求項1に記載のタンパク質をコードするDNA。

【請求項4】 配列番号：1の塩基配列を含む請求項3記載のDNA。

【請求項5】 配列番号：1の塩基配列を持つDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、請求項1に記載のタンパク質またはこれらタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA。

【請求項6】 請求項4に記載のDNAと特異的にハイブリダイズするDNAであって、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つDNA。

【請求項7】 請求項4に記載のDNAもしくはその一部に対するアンチセンスDNA。

【請求項8】 請求項3、請求項4、および請求項5のいずれかに記載のDNAを含むことを特徴とするベクター。

【請求項9】 請求項3、請求項4、および請求項5のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転換細胞。

【請求項10】 請求項9に記載の形質転換細胞を培養し、請求項3、請求項4、および請求項5のいずれかに記載のDNAの発現産物を回収することを特徴とする、請求項1に記載のタンパク質の製造方法。

【請求項11】 請求項6のDNAを含むメサンギウム細胞の検出用試薬。

【請求項12】 請求項1に記載のタンパク質に結合することを特徴とする抗体。

【請求項13】 配列番号：2のアミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列を持つタンパク質の一部を認識する請求項12の抗体。

【請求項14】 抗体がモノクローナル抗体である請求項13の抗体。

【請求項15】 請求項13または請求項14のいずれかに記載の抗体と請求項2

のタンパク質、またはその断片との免疫学的な結合に基づいて請求項2のタンパク質またはその断片を測定する免疫学的測定方法。

【請求項16】請求項12～請求項14のいずれかに記載の抗体を含む、メサンギウム細胞の検出用試薬。

【請求項17】生体試料中に含まれる請求項2のタンパク質またはその断片を測定し、正常試料から得られた測定値と比較することによってメサンギウム増殖性腎症を検出する方法。

【請求項18】メグー3をコードする遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

【請求項19】非ヒト脊椎動物がマウスである請求項18のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

【請求項20】メグー3をコードする遺伝子の発現が抑制されたノックアウトマウスである請求項19のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子工学の分野に属し、特に腎細胞の遺伝子の単離に関する。

【0002】

【従来の技術】

体内の60兆個もの様々な細胞が、本質的に同一のゲノムDNAを有している。正常な生理学的機能のために、これらの遺伝子の発現は、細胞系統、および細胞が受容するシグナルにより厳密に制御されている。従って、個々の細胞型に発現している遺伝子を解明することは極めて重要である。

メサンギウム細胞(mesangial cell)は、腎糸球体の構造および機能の維持に中心的な役割を果たしている。そしてメサンギウム細胞は、各種腎炎においても中心的な病態生理学的意義を有する。例えばメサンギウム細胞の増殖、および細胞外の糸球体間質マトリックスの蓄積は、慢性腎炎および糖尿病性腎症のような様々な糸球体疾患の患者の糸球体硬化症の重要な病理所見である。従って、メサンギウム細胞で発現している遺伝子を見いだしその機能を明らかにすることは、メ

サンギウム細胞の生物学的性質の解明、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因の究明、ひいては、メサンギウム細胞に関連する疾病的治療、診断等に有効である。

【0003】

メサンギウム細胞のマーカーとしては、ラットではThy1抗原が知られている。しかしこの遺伝子はメサンギウム細胞特異的ではないうえ、ヒトではメサンギウム細胞には発現していない（Miyata T. et al., *Immunology*(1989); 67: 531-533; Miyata T. et al., *Immunology*(1990); 69: 391-395）。また、メサンギウム細胞は活性化されると α 平滑筋アクチンを発現することが知られているが、この遺伝子もメサンギウム細胞特異的ではない。このように、メサンギウム細胞に特徴的な遺伝子については、従来報告がなかった。

【0004】

なお本発明者は、先にメサンギウム細胞に特異的に発現しているタンパク質としてメグシンを報告している（J.Clin.Invest, 1998 Aug 15, 120:4,828-36）。本発明は、このメグシンとも明確に異なった構造を持つ新規なタンパク質に関する。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、メサンギウム細胞で高度に発現される遺伝子を単離することを課題とする。

【0006】

【問題点を解決するための手段】

本発明者は、ヒトメサンギウム細胞のインビトロ培養物からmRNAを単離し、3'側のcDNAライブラリーを作成した。そしてこのcDNAライブラリーに含まれる多数のクローニングランダムに選択してその塩基配列を決定した。次いで決定した塩基配列を、種々の臓器及び細胞から得られた既知の3'側のcDNAクローニングの塩基配列と比較することによって、メサンギウム細胞で特異的に発現しているクローニングを選択した。そしてメサンギウム細胞から調製したλZIPLox cDNAライブラリーを、このクローニングのインサートをプローブとしてスクリーニングし、ポジティブクロ

ーンの全塩基配列(3782bp)を決定して本発明を完成した。更にKozakの翻訳開始コドンを有する最も長いオープンリーディングフレームに基づくアミノ酸配列を決定した。この推定アミノ酸配列を持つ本発明によるタンパク質を、本発明者はメグー3(Meg-3)と命名した。ヒト・メグー3のcDNAの塩基配列を配列番号：1に、ヒト・メグー3の推定アミノ酸配列を配列番号：2に示した。配列番号：1に示す塩基配列に対して相同性を持つ塩基配列は、配列番号：1の3'末端から300～500塩基に対して90%以上のホモロジーを持つESTが検索された他には確認することができなかった。

【0007】

このアミノ酸配列について、SwissProtデータベースのアミノ酸配列とホモロジー検索を行い、メグー3が新規なタンパク質であることを確認した。更に本発明のメグー3の推定アミノ酸配列についてモチーフ検索を試みたところ、N末端から数えて500番目以降の領域において、proline rich proteinと呼ばれる多くのタンパク質と良く似たアミノ酸配列が見出された。特に621番目～701番目に至る81アミノ酸残基からなる領域は、プロリンに富み(27.2%)、SH3(Src homology 3)ドメインに結合するproline richペプチド(PRペプチド)のアミノ酸配列(xPxxPPPFXP)に類似するアミノ酸配列(xPESPPPAXP)を2ヶ所に有する。このことから、メグー3タンパク質のC末端構造は、PRドメインとしてSrcファミリーなどの細胞内シグナル伝達物質のSH3ドメインに結合できる可能性、そしてシグナル伝達系に関与する可能性が示唆された。配列番号：2のアミノ酸配列からなるタンパク質の細胞質局在の可能性が高い(52.2%)ことからも、メグー3がシグナル伝達に関与する可能性が大きいことが示唆される。この領域の他(N末端から1～550番目のアミノ酸)では、特に相同性の高いアミノ酸配列を見出すことはできなかった。

ヒトの初代培養細胞においては、メグー3遺伝子がメサンギウム細胞で特に高度に発現していることが特徴的である。その他の初代培養細胞では、腎皮質上皮細胞や纖維芽細胞で発現が観察され、ヒトの臍帯静脈内皮細胞や平滑筋細胞においてはわずかな発現が観察される。更にノーザンブロッティングによりメグー3の組織分布をみたところ、メグー3は胎盤、次いで肺において高度な発現が観察

される。その他、腎、肺、および心では弱い発現が見られ、肝、および骨格筋ではわずかな発現が観察されるのみである。脳では、メグー3の発現は検出できない。本発明はこれらの知見に基づいて完成されたものである。

【0008】

すなわち、本発明は具体的には以下のタンパク質、DNA、並びにそれらの用途に関する。

〔1〕配列番号：2に記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、このアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

〔2〕配列番号：2のアミノ酸配列を含む〔1〕のタンパク質。

〔3〕〔1〕に記載のタンパク質をコードするDNA。

〔4〕配列番号：1の塩基配列を含む〔3〕記載のDNA。

〔5〕配列番号：1の塩基配列を持つDNAとストリンジエントな条件下ハイブリダイズし、〔1〕に記載のタンパク質またはこれらタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA。

〔6〕〔4〕に記載のDNAと特異的にハイブリダイズするDNAであって、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つDNA。

〔7〕〔4〕に記載のDNAもしくはその一部に対するアンチセンスDNA。

〔8〕〔3〕、〔4〕、および〔5〕のいずれかに記載のDNAを含むことを特徴とするベクター。

〔9〕〔3〕、〔4〕、および〔5〕のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転換細胞。

〔10〕〔9〕に記載の形質転換細胞を培養し、〔3〕、〔4〕、および〔5〕のいずれかに記載のDNAの発現産物を回収することを特徴とする、〔1〕に記載のタンパク質の製造方法。

〔11〕〔6〕のDNAを含むメサンギウム細胞の検出用試薬

〔12〕〔1〕に記載のタンパク質に結合することを特徴とする抗体。

〔13〕配列番号：2のアミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列を持つタンパ

ク質の一部を認識する〔12〕の抗体。

〔14〕抗体がモノクローナル抗体である〔13〕の抗体。

〔15〕〔13〕または〔14〕のいずれかに記載の抗体と〔2〕のタンパク質、またはその断片との免疫学的な結合に基づいて〔2〕のタンパク質またはその断片を測定する免疫学的測定方法。

〔16〕〔12〕～〔14〕のいずれかに記載の抗体を含む、メサンギウム細胞の検出用試薬。

〔17〕生体試料中に含まれる〔2〕のタンパク質またはその断片を測定し、正常試料から得られた測定値と比較することによってメサンギウム増殖性腎症を検出する方法。

〔18〕メグー3をコードする遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

〔19〕非ヒト脊椎動物がマウスである〔18〕のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

〔20〕メグー3をコードする遺伝子の発現が抑制されたノックアウトマウスである〔19〕のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

【0009】

【発明の実施の形態】

前記課題を達成するために本発明者は、3'領域cDNAライブラリー(3'-directed cDNA library)を用いた。この方法により、cDNAの大きさによって左右されるクローニング効率の変動を回避することができる。3'領域の配列は遺伝子に特有なものであり、約200～300bpの配列データは、遺伝子の特徴を明らかにするのに充分である(Yasuda Y., Miyata T. et al., Kidney Int, 1998 Jan, 53:1, 154-8)。

【0010】

本発明のヒト・メグー3をコードするDNAは、メサンギウム細胞からmRNAを調製した後、既知の方法により二本鎖cDNAに変換することにより得ることができる。mRNAの調製はグアニジンイソチオシアネート-塩化セシウム法 [Chirwin, et al. Biochemistry 18, 5294 (1979)]、デオキシリボヌクレアーゼ存在下に界面活性剤処理、フェノール処理を行なう方法 [Berger&Birkenmeier, Biochemistry

18, 5143 (1979)]などを用いることができる。全RNAからのpoly(A)⁺RNAの調製はオリゴ(dT)を結合した担体（例えばセファロース、セルロースやラテックス粒子等）を用いたアフィニティクロマトグラフィーなどを用いて行なうことができる。得られたmRNAを鑄型として、3'端にあるpoly(A)鎖に相補的なオリゴ(dT)、ランダムプライマー、あるいはメグー3のアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理することによってcDNA(1st strand)を得ることができる。mRNAとそれに相補的なcDNAとで構成されるハイブリッドのmRNAをE. Coli RNase Hで部分的に切断し、これをプライマーとしてE. Coli DNA polymerase IによりcDNA(2nd strand)が合成される。最終的にE. Coli DNA Ligaseで処理することにより、二本鎖cDNAを得ることができる。

【0011】

ヒト・メグー3遺伝子塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、メサンギウム細胞poly(A)⁺RNAを鑄形にしてRT-PCR法によりクローニングすることも可能である。また、PCRによらず、ヒト・メグー3遺伝子塩基配列をもとにプローブを合成し、直接cDNAライブラリーをスクリーニングし、目的とするcDNAを得ることもできる。本発明の遺伝子は、これらの方針により得られた遺伝子の中から、その遺伝子の塩基配列を確認することにより、選択することができる。マウスとラット等、ヒト以外の種におけるメグー3のホモログについても、同様の手法によりcDNAの取得が可能である。

【0012】

あるいは、メグー3のホモログのcDNAを以下のような手法によって単離することも可能である。すなわち、前記ヒト・メグー3 cDNAの塩基配列をプローブとして用い、cDNAライブラリーをコロニーハイブリダイゼーションやブラークハイブリダイゼーションによってスクリーニングして、メグー3のホモログをコードするcDNAを単離することができる。cDNAライブラリーは、マウス、ラットの組織や、培養メサンギウム細胞等から抽出したmRNAを鑄型として合成することができる。あるいは、市販cDNAライブラリー（フナコシ製等）を用いることもできる。この他に、本発明によるヒト・メグー3のcDNAをもとに、オープンリーディングフレームの前後にディジェネレーティブプライマーを設計し、これを用いたPCR

によって亦モログのcDNAを増幅する方法を用いることもできる。

[0013]

ヒト・メグー3ゲノムは、ゲノミックライブラリーのスクリーニングによって得ることができる。ゲノミックライブラリーは、たとえばヒトBリンパ芽球からゲノムを調製し、Sau3で部分的に切断したDNAをファージベクターであるEMBL3に組み込むことにより合成することができる（Blood, vol 83, No 11, 1994: pp3126-3131）。このようなゲノミックライブラリーについて、マークハイブリダイゼーション法（新細胞工学実験プロトコール、秀潤社、pp79-92、参照）を行えば、目的とするゲノムを含むクローンを取得できる。プローブとしては、メグー3 cDNAのオープンリーディングフレーム全ての領域（2202bp）、またはcDNA部分をプライマーとしてヒトゲノムDNAをPCR法を用いて増幅することにより得られた各エキソン-イントロン部分を用いることができる。また、同時に調節領域に関しても、ヒト培養メサンギウム細胞由来mRNA、もしくはヒト腎臓mRNA（Clontech社より購入）を鑄型として、5' RACE法（5'-Full RACE Core Set（宝酒造（株）の方法に従う））を用いて5' UTRの配列決定を行うことができる。

本発明の遺伝子は、例えばホスホアミダイト法 [Mattencci, M.D. & Caruthers, M. H. J. Am. Chem. Soc. 103, 3185(1981)]、ホスファイト・トリエステル法 [Hunkapiller, M. et al. Nature 310, 105 (1984)] 等の核酸の化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

[0 0 1 4]

なお、一般に、真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子で知られているように多形現象を示すことが多い。この多形現象によって、アミノ酸配列に1個あるいはそれ以上のアミノ酸の置換を生じても、通常タンパク質の活性は維持される。また一般に、1個または数個のアミノ酸の改変では、タンパク質の活性は維持される場合が多いことが知られている。従って、配列番号：2に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものを用いて得られたタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り、すべて本発明に含まれる。また、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を人工的に改変したタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り

、すべて本発明に含まれる。

【0015】

その他、本発明のタンパク質には、配列番号：2に記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、本発明によるメグー3と機能的に同等なタンパク質が含まれる。なお本発明において機能的に同等とは、メグー3と同等の生物学的特性を持つことを意味する。本発明者は、メグー3にたとえば以下のような生物学的な特性を見出している。

【0016】

まずメグー3は、SH3ドメインとの結合性が推測されるPRドメインを備えていることから、シグナル伝達系に関与する可能性がある。SH3ドメインは、Srcファミリーなどをはじめとして、各種細胞内シグナル伝達物質が有するドメインの一つである。配列番号：2のアミノ酸配列からなるタンパク質の細胞質局在の可能性が高い(52.2%)ことからも、メグー3がシグナル伝達に関与する可能性が大きいことが示唆される。

【0017】

またメグー3は、次のような発現特性を持っている。まず、ヒトの初代培養細胞においては、メグー3遺伝子がメサンギウム細胞で特に高度に発現していることが特徴的である。その他の初代培養細胞では、腎皮質上皮細胞や纖維芽細胞で発現が観察され、ヒトの臍帯静脈内皮細胞や平滑筋細胞においてはわずかな発現が観察される。更にノーザンプロットティングによりメグー3の組織分布をみると、メグー3は胎盤、次いで脾において高度な発現が観察される。その他、腎、肺、および心では弱い発現が見られ、肝、および骨格筋ではわずかな発現が観察されるのみである。脳では、メグー3の発現は検出できない。各組織におけるメグー3の発現状態は、たとえば配列番号：1から選択された塩基配列を持つプライマーによって、各組織から調製したmRNAを試料としてノーザンプロットアッセイを行うことによって知ることができる。

【0018】

以上のような生物学的特性について、機能的に同等なタンパク質は、いずれも

本発明によるメグー3を構成する。したがって、具体的に構造を明らかにしたヒトのメグー3のみならず、構造的にあるいは機能的に同等な他の種のホモログは本発明に含まれる。

【0019】

また、本発明のDNAには、これらの機能的に同等なタンパク質をコードするDNAが含まれる。これらのタンパク質をコードするDNAは、cDNAのみならずゲノムDNAや合成DNAであることもできる。

また、所望のアミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる [Grantham, R. et al. Nucleic Acids Res. 9, r43 (1981)]。従って、コドンの縮重を考慮して、DNAを適宜改変したものもまた本発明のDNAに含まれる。所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的変位導入法 (sitespecific mutagenesis) [Mark, D.F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 5662 (1984)] 等にしたがって、これら核酸配列のコドンを一部改変することができる。

【0020】

更に、配列番号：1に記載の塩基配列を含むDNAとハイブリダイズすることができ、かつそのDNAによってコードされるタンパク質が本発明によるメグー3に特徴的な機能を有する限り、そのDNAは本発明によるDNAに含まれる。ストリンジエントな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。ストリンジエントな条件とは、一般的には以下のようないくつかの条件を示すことができる。すなわち、 $4 \times SSC$ 、 65°C でハイブリダイゼーションさせ、 $0.1 \times SSC$ を用いて 65°C で1時間洗浄する。ストリンジエンシーを大きく左右するハイブリダイゼーションや洗浄の温度条件は、融解温度(T_m)に応じて調整することができる。 T_m はハイブリダイズする塩基対に占める構成塩基の割合、ハイブリダイゼーション溶液組成（塩濃度、ホルムアミドやドデシル硫酸ナトリウム濃度）によって変動する。したがって、当業者であればこれらの条件を考慮して同等のストリンジエンシーを与える条件を経験的に設定することができる。

変異体も含め本発明によるDNAの塩基配列は、公知の技術に基づいてさまざまな用途に利用することができる。

【0021】

このようにしてクローニングされたメグー3をコードする遺伝子は適当な発現ベクターDNAに組み込むことにより、他の原核細胞または真核細胞の宿主を形質転換させることができる。さらに、これらの発現ベクターに適当なプロモーターおよび形質発現に係る配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現することが可能である。発現ベクターとしては、例えば大腸菌の場合はpET-3 [Studier & Moffatt, J. Mol. Biol. 189, 113(1986)] 等が、COS細胞の場合はpEF-BOS [Nucleic Acids Research 18, 5322 (1990)]、pSV2-gpt [Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 2072 (1981)] 等が、CHO細胞の場合はpVY1 [国際公開第89/03874号公報] 等がそれぞれ挙げられる。また、目的とする遺伝子に他のポリペプチドをコードする遺伝子を連結して融合タンパク質として発現させることにより、精製を容易にし、その後目的タンパク質を切り出すことも可能である。融合させるタンパク質としては、ヒスチジンタグ、c-mycタグ、MBP-タグ、あるいはGST-タグ等が知られている。これらのタグを融合させた状態でインサートを発現させることができるベクターは市販されている。

【0022】

本発明の発現系に用いる宿主のうち原核生物宿主細胞としては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) が挙げられる。また真核生物のうち、真核微生物の宿主細胞としては、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等が挙げられる。一方哺乳動物由来の宿主細胞としては、例えばCOS細胞、CHO細胞、BHK細胞等が挙げられる。なお、本発明の形質転換体の培養は、宿主細胞に適した培養条件を適宜選択して行なえばよい。

【0023】

以上のようにして目的とするメグー3をコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養し、產生されたメグー3は、細胞内または細胞外から分離し均一なタンパク質にまで精製することができる。なお、本発明の目的タンパク質であるメグー3の分離、精製は、通常のタンパク質で用いられる分離、精製方法を使用

すればよく、何ら限定されるものではない。例えば各種クロマトグラフィー等を適宜選択し、組み合わせれば、メグー3を分離、精製することができる。

なお、上述の他、本発明の遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該ベクターによる形質転換体および該遺伝子を用いたメグー3の製造過程における遺伝子操作の処理手段は、「Molecular Cloning-A Laboratory Manual」(Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.)に記載の常法に従って行うことができる。

【0024】

この他、配列番号：1に記載の塩基配列に基づいて、メグー3遺伝子を検出するためのプローブを設計することができる。あるいは、これらの塩基配列を含むDNAやRNAを増幅するためのプライマーを設計することができる。与えられた塩基配列をもとに、プローブやプライマーを設計することは当業者が日常的に行っていることである。設計された塩基配列を持つオリゴヌクレオチドは化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、さまざまなフォーマットのハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。あるいは、PCRのような核酸の合成反応に利用することができる。プローブやプライマーを利用するオリゴヌクレオチドは、少なくとも15塩基、好適には25-50塩基の長さとするのが望ましい。

本発明によるメグー3遺伝子は、インサイチュハイブリダイゼーションの結果、腎臓の組織中では特にメサンギウム細胞で特異的に発現している。したがって、メグー3遺伝子に特異的にハイブリダイズする本発明に基づくオリゴヌクレオチドは、メサンギウム細胞の特異的な検出を可能とするプローブやプライマーとして有用である。メサンギウム細胞は腎糸球体機能と密接に関連していることから、本発明によるオリゴヌクレオチドは、腎臓の病理学的な解析において有用なツールとなりうる。

【0025】

更に本発明が明らかにしたメグー3をコードする遺伝子の塩基配列に基づいて、メグー3の発現を制御しうるアンチセンス核酸が提供される。本発明によるアンチセンス核酸は、メグー3のメサンギウム細胞における役割を明らかにするための重要なツールとなる。あるいはメグー3の発現亢進によってもたらされる病

態の制御に有用である。アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNAポリメラーゼによって局部的に開状ループ構造がつくられた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつあるRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、インtronとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNAとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNAの翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるタンパク質鎖に伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制、などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する(平島および井上「新生化学実験講座2 核酸 I V 遺伝子の複製と発現」,日本生化学会編,東京化学同人,pp.319-347,1993)。

【0026】

本発明で用いられるアンチセンス配列は、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であろう。しかし、コード領域もしくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むDNAも、本発明で利用されるアンチセンスDNAに含まれる。使用されるアンチセンスDNAは、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製されたDNAは、公知の方法で、所望の宿主へ形質転換できる。アンチセンスDNAの配列は、形質転換する宿主が持つ内在性遺伝子(あるいはその相同遺伝子)、またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有效地に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。

【0027】

アンチセンスDNAを錆型として転写されたRNAが、標的遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%、最も好ましくは95%の相補性を有するように設計する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスDNAの長さは、少なくとも15塩基以上であり、好ましくは100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上である。通常、用いられるアンチセンスRNAの長さは2.5kbよりも短い。

【0028】

更に本発明が提供するメグー3のcDNA塩基配列に基づいて、ゲノム中に存在するメグー3遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域を取得することができる。具体的には、特開平6-181767号公報、「The Journal of Immunology(1995)155,2477-2486, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995),92,3561-3565」等と同様の方法でこれらの制御領域の取得が可能である。なお、本明細書において、プロモーター領域とは転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御するDNA領域を、エンハンサー領域とはイントロンまたは3'UTRに存在する遺伝子の発現を制御するDNA領域をいう。

【0029】

具体的には、プロモーター領域は、例えば、以下の方法によって取得することができる。

- 1) メグー3のcDNAの5'末端側をプローブとし、ヒトゲノムライブラリーよりメグー3のプロモーター領域をクローニングする。
- 2) 制限酵素消化してメグー3遺伝子の翻訳開始コドンを含むその上流部分(2~5 kbp)のプロモーター領域を含むDNAを得、塩基配列を決定する。ヒトメサンギウム細胞から調製したpoly(A)⁺RNAを錆型とし、メグー3遺伝子の5'末端側cDNA配列より選択したプライマー-DNAを用いたプライマー伸長法により、転写開始点(+1)を決定する。塩基配列から転写因子結合配列を検索し、プロモーター活性を有する可能性がある箇所を予想する。
- 3) 2)で得たDNAからメグー3遺伝子のコード領域を除いたDNA断片をプラスミド上にサブクローニングし、このDNA断片の2~5 kbp下流に、レポーター遺伝子

としてのクロラムフェニコールアセチル転位酵素（C A T）遺伝子、あるいは、ルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを構築する。同様に、プロモーター領域の可能性がある各箇所を含むような形で、制限酵素消化により、或いは、P C Rにより、5'末端側及び3'末端側を順次削ったメグー3遺伝子上流部分の様々な部位に該当するDNA断片を作成し、これらの下流に、レポーター遺伝子としてのC A T遺伝子、あるいは、ルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを構築する。

4) 3) で作製したレポータープラスミドで形質転換した動物細胞のC A T或いはルシフェラーゼ活性を測定することにより、メグー3遺伝子上流部分に存在するプロモーター領域を得る。

また、3' UTR、イントロン中のエンハンサー領域は、メグー3 cDNAをプローブとし、ヒトゲノムライブラリーよりヒト・メグー3のゲノム遺伝子をクローニングし、上述のプロモーターに関する方法と同様にして、エンハンサー活性を有する領域を得ることができる。

【0030】

メグー3遺伝子の発現を制御している転写因子は、「新細胞工学実験プロトコール（秀潤社）」、「バイオマニュアルシリーズ5 転写因子研究法（羊土社）」、「DNA & Cell Biology, 13, 731-742 (1994)」に記載の方法等の公知の方法、例えば、アフィニティカラムを用いた方法、サウスウェスタン法、フットプリントティング法、ゲルシフト法、またはone-hybrid法で得ることができる。なお、本明細書において、転写因子とはメグー3遺伝子の転写を調節している因子で、転写の開始反応を誘導する転写開始因子と、転写を正または負に調節する転写調節因子をさす。

【0031】

アフィニティカラム法を用いる場合は、前述の方法で得た、プロモーター領域、エンハンサー領域をセファロース或いはラテックスビーズに固定化したカラムに、核抽出液をかけ、カラムを洗浄後、カラムに固定化した配列と同様の配列を有するDNAを用い、結合した転写因子を溶出することによって、メグー3遺伝子の発現を制御している転写因子を得ることができる。

【0032】

また、サウスウェスタン法を用いる場合は、大腸菌の発現ベクター（例えば λ gt11）に挿入したcDNAの発現産物を標識プローブによってスクリーニングする。たとえばスクリーニングすべきcDNAを β -ガラクトシダーゼとの融合タンパク質として発現させ、これをニトロセルロース膜に吸着させる。次いで放射性同位元素で標識されたプロモーター領域やエンハンサー領域のDNA断片をプローブにし、結合活性をもつ融合タンパク質を合成するファージを選択することによって、メグー3遺伝子の発現を制御している転写因子を得ることができる。

【0033】

ゲルシフト法は、遊離のDNAがタンパク質と結合したときにポリアクリルアミドゲルによる電気泳動の移動度に差を生じる現象に基づいている。プロモーター領域やエンハンサー領域のDNA断片をプローブとし、転写因子が含まれる試料（たとえば核蛋白質抽出液）と混合して、低イオン強度の元で電気泳動分析する。転写因子の結合は、遊離のDNAとは違った移動度のバンドとして検出される。ゲルシフト法は、タンパク質の混合物から高い感度で転写因子を分離することができる。

【0034】

ゲルシフト法によって得られたDNAと転写因子の複合体を、更にフットプリント法によって解析すると、転写因子の結合部位を決定することができる。フットプリント法は、DNA上にタンパク質が結合するとDNase Iの消化から保護される現象を利用している。すなわち、末端を 32 Pで標識したプロモーター領域やエンハンサー領域のDNAを、転写因子の共存化でDNase Iによって部分消化し、これを塩基配列決定用の変性ポリアクリルアミドゲルで分離する。転写因子の無い状態で同様の処理を行った結果と比較すると、転写因子の結合によってバンドの消失が観察されることから、その結合部位の推定が可能となる。

【0035】

本発明はまた、メグー3を認識する抗体を提供する。本発明の抗体には、例えば、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に対する抗体が含まれる。メグー3または本発明のメグー3の部分ペプチドに対する抗体（例えばポ

リクローナル抗体、モノクローナル抗体) または抗血清は、本発明のメグー3、本発明のメグー3の部分ペプチド、あるいは本発明によるc-myc-(His)₆-Tag-メグー3やMBP-メグー3のような融合タンパク質を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

【0036】

本発明のメグー3、または本発明のメグー3の部分ペプチドは、温血動物に対して投与による抗体産生が可能な部位に、公知の担体や希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュvantや不完全フロイントアジュvantを投与してもよい。投与は通常1~6週毎に1回ずつ、計2~10回程度行われる。抗体産生に用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、あるいはニワトリ等が挙げられるが、マウスおよびウサギが好ましく用いられる。

【0037】

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2~5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化メグー3と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法 (Nature, 256, 495 (1975)) に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール (PEG) やセンドライウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

【0038】

骨髄腫細胞としては例えばX-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などが挙げられるが、X-63Ag8が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1:20~20:1であり、PEG(好ましくはPEG100~PEG6000)が10~80%程度の濃度で添加され、20~40℃、好ましくは30~37℃で1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。メグー3抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できる

が、例えばメグー3抗原を直接又は担体と共に吸着させた固相（例えば、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体）が用いられる。またはプロテインAを加え、固相に結合した抗メグー3モノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体又はプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したメグー3を加え、固相に結合した抗メグー3モノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

【0039】

抗メグー3モノクローナル抗体の選別およびクローニングは、自体公知またはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いてもよい。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI1640培地（大日本製薬（株））、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））、またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日本製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗メグー3抗体価の測定と同様にして測定できる。クローニングは、通常半固体アッガー法や限界希釀法などのそれ自体公知の方法で行うことができ、クローン化されたハイブリドーマは、好ましくは無血清培地中で培養され、至適量の抗体をその上清に与える。目的のモノクローナル抗体は腹水化して得ることもできる。

【0040】

本発明によるモノクローナル抗体は、メグー3に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって他のタンパク質と交差しないものとすることができる。一般的に、そのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも7以上のアミノ酸残基、望ましくは10-20アミノ酸のアミノ酸配列によっ

て提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すといわれている。したがって、配列番号：2に記載されたアミノ酸配列から選択され、かつ連続する少なくとも7アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は、本発明におけるメグー3特異的なモノクローナル抗体といえる。

【0041】

抗メグー3モノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行われる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例えばDEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルfiltration法、抗原結合固相またはプロテインAまたはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を示すことができる。

【0042】

このようにして得られたメグー3を認識する本発明によるモノクローナル抗体、あるいはポリクローナル抗体は、メサンギウム細胞に関連する疾病的診断や治療に利用することが可能である。これらの抗体を用いてメグー3を測定する方法としては、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とによりメグー3を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識ヒト・メグー3と検体中のヒト由来メグー3を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のヒト由来メグー3を測定する競合法等を示すことができる。

【0043】

サンドイッチ法によるメグー3の測定においては、まず、固定化抗体とメグー3とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体-メグー3標識化抗体を形成させる2ステップ法、もしくは固定化抗体、標識化抗体およびメグー3を同時に混合する1ステップ法などを用いることができる。

【0044】

測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリブ

ロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属などが挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、粒子状、纖維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

【0045】

抗体の固相化は、公知の化学結合法又は物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニイミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート及びN-スクシニイミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3-（2-ピリジルジチオ）プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる2種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固相化させておいて捕捉することも可能である。

【0046】

標識物質は、免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。具体的には、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質、金属キレート等を使用することができる。好ましい標識酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、 α -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼ等が挙げられる。好ましい蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フ

イコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、およびオルトタルアルデヒド等が挙げられる。好ましい発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリン等が挙げられる。そして好ましい放射性物質としては、¹²⁵I、¹²⁷I、¹³¹I、¹⁴C、³H、³²P、あるいは³⁵S等が挙げられる。

【0047】

前記標識物質を抗体に結合する手法は公知である。具体的には、直接標識と間接標識が利用できる。直接標識としては、架橋剤によって抗体、あるいは抗体断片と標識とを化学的に共有結合する方法が一般的である。架橋剤としては、N,N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4,4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤を利用することができる。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。この他、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサール又はフルオレサミンのような低分子ハプテンを結合させておき、これを認識する結合成分によって間接的に標識する方法を採用することもできる。ビオチンに対してはアビジンやストレプトアビジンが認識リガンドとして利用される。一方、ジニトロフェニル、ピリドキサール又はフルオレサミンについては、これらのハプテンを認識する抗体が標識される。抗体を標識する場合、西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いることができる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができるので有利である。また、抗体としては場合によっては、そのフラグメント、例えばFab'、Fab、F(ab')₂を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体はアフィニティーコロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、防腐剤としてチメロサール(Thimerosal)等を、そして安定剤としてグリセリン等を加えて保存する。標識抗体は、凍結乾燥して冷暗所に保存す

ることにより、より長期にわたって保存することができる。

【0048】

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤が用いられる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液としてH₂O₂を用い、発色剤として2,2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩(ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン等を使用することができる。酵素にアルカリフェヌラターゼを用いる場合は、基質としてオルトニトロフェニルフェヌラターゼ、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができる。酵素にβ-D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイン-ジ-(β-D-ガラクトピラノシド)、4-メチルウンベリフェニル-β-D-ガラクトピラノシド等を使用することができる。本発明は、また、前述のモノクローナル抗体、あるいはポリクローナル抗体を標識して、あるいは固相化してメグー3の免疫学的測定用試薬としたもの、更にはこの試薬に標識検出用の指示薬や対照試料等をキット化したのものをも含むものである。

本発明におけるメグー3の測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液、あるいは脳脊髄液等の体液等、メグー3、あるいはメグー3の前駆体や断片を含む生体試料であれば限定されない。

【0049】

加えて本発明は、メグー3遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物に関する。ここでメグー3遺伝子とは、メグー3をコードするcDNA、ゲノムDNAあるいは合成DNAを含む。また、遺伝子の発現には、転写と翻訳のいずれのステップも含まれる。本発明によるトランスジェニック動物は、メグー3の機能あるいは発現調節の研究、ヒトのメサンギウム細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

本発明においては、メグー3遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位(エンハンサー、プロモーター、イントロン等)の一部に欠失、置換、挿入などの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して

人工的に上昇または下降するように修飾することができる。このような修飾は、メグー3遺伝子の転写の調節である。一方、エキソンの一部を欠損させたり、翻訳領域への点突然変異の導入により終止コドンへ置換することにより、タンパク質への翻訳を修飾することもできる。この変異の導入は、公知の方法により行うことができ、トランスジェニック動物を得ることができる。

【0050】

トランスジェニック動物とは狭義には遺伝子組換えにより、外来遺伝子が生殖細胞に人为的に導入された動物のことをいい、広義にはアンチセンスRNAを用いて特定の遺伝子の機能を抑えたアンチセンス・トランスジェニック動物や、胚性幹細胞(ES細胞)を用いて特定の遺伝子をノックアウトさせた動物、点突然変異DNAを導入した動物を含み、個体発生の初期に外来遺伝子が安定して染色体に導入され、その子孫に遺伝形質として伝達され得る動物のことをいう。本明細書中でいうトランスジェニック動物とはヒト以外のすべての脊椎動物を含む。

トランスジェニック動物の作製方法は、遺伝子と卵を混合させてリン酸カルシウムで処理する方法や、位相差顕微鏡下で前核期卵の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法(マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号)、胚性幹細胞(ES細胞)を使用する方法などがある。その他、レトロウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵に導入する精子ベクター法等が開発されている。精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込まれた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である(M. Lavitano et al Cell, 57, 717, 1989)。

あるいはバクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系やSaccharomyces cerevisiaeのFLPリコンビナーゼ系等のin vivoにおいて部位特異的遺伝子組み換えを用いることもできる。また、レトロウィルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。

【0051】

マイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物作製方法は、例えば以下に示すようにして行われる。まず、発現制御に関わるプロモーター、特定

のタンパク質をコードする遺伝子、ポリAシグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左右され、また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェニック動物は系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。非翻訳領域やスプライシングにより発現量が変化することが判明しているため、予めポリAシグナルの前にスプライシングされるイントロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子はできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス（5～6週齢）、交配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いられる。

【0052】

効率よく受精卵を得るために、ゴナドトロピン等により排卵を誘発してもよい。受精卵を回収し、マイクロインジェクション法にて卵の雄性前核にインジェクションピペット中の遺伝子を注入する。注入した卵を輸卵管に戻すための動物（偽妊娠雌マウス等）を用意し、一匹に対して約10～15個を移植する。その後、誕生したマウスにトランスジーンが導入されているか否か、尾の先端部からゲノムDNAを抽出し、サザン法あるいはPCR法によりトランスジーンを検出するか、あるいは相同組み換えが起こったときのみに活性化するマーカー遺伝子を挿入したポジティブクローニング法により選択することができる。さらに、トランスジーンの発現を確認するため、ノザン法もしくはRT-PCR法によりトランスジーン由来転写産物を検出する。または、タンパク質に対する特異的抗体によって、ウェスタンブロッティング法による検出も可能である。

【0053】

本発明のノックアウトマウスは、マウスマター3遺伝子の機能が失われるよう処理されたものである。ノックアウトマウスとは相同組換え技術で任意の遺伝子を破壊し、機能を欠損させたトランスジェニックマウスをいう。胚性幹細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウトマウスを作製することができる。例えば、受精卵の胚盤胞や8細胞期胚に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚

由来の細胞が混ざったキメラマウスを得る。このキメラマウス（キメラとは、2個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう）と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体マウスを作製することができる。さらに、ヘテロ接合体マウス同士を交配することで、ホモ接合体マウスが作製できる。本発明によるトランスジェニック動物は、これらヘテロ接合体と、ホモ接合体のいずれをも含むものである。

相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして使ったPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明する。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

以下本発明を実施例として更に具体的に説明するが、本発明は該実施例に限定されるものではない。

【0054】

【実施例】

【実施例1】ヒトメサンギウム細胞の初代培養

58才の男性から摘出した正常なヒト腎臓から、ヒト糸球体腎臓メサンギウム細胞を単離した。腎皮質を、無菌条件下で分離し、細分化し、いくつかの篩を通過させた。用いる篩は、段階的に孔径を小さくしていった。75~200 μm の孔径の篩に捕捉された糸球体を、洗浄し、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のコラゲナーゼ（Washington Biochemical社製）と共に37°Cで20分間インキュベートした。洗浄後、糸球体を、25mM HEPES、10% Nu-serum（Collaborative Biomedical Products社, Bedford, MA）および抗生物質（10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のペニシリン、ストレプトマイシン、およびファンギゾン）を含む培地199（Gibco BRL社, Gaithersburg, MD）に再懸濁させ、5%CO₂インキュベーター内でインキュベートした。3継代目に、メサンギウム細胞を、

典型的な形態学的特徴、トリプシン、ピューロマイシンおよびD-バリンに対する耐性、アクチン (Zymed Laboratories社, San Francisco, CA) 、抗VLA(very late antigen)-1,3,5 (Immunotech) の免疫染色に対して陽性を示すこと、ならびに第VIII因子 (Dako社, CA) の免疫染色に陰性を示すことなどの一連の基準により同定した。

【0055】

[実施例2] ヒト培養メサンギウム細胞からのmRNAの単離

6 繼代目に、グアニジンイソチオシアネート (GTC) 法を用いて、全RNAをヒトメサンギウム細胞から単離した。即ち、実施例1の細胞の血清を含む培養液中のメサンギウム細胞コンフルエント培養物をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、5.5 mM GTC溶液中で溶解させた。DNAは18ゲージの針を通過させることにより除去した。核およびその他の細胞破片は5,000×gで90秒間遠心分離することにより沈殿させた。上清をセシウムトリフルオロアセテート (CsTFA) 層に注意深く載せ、15°C、125,000×gで24時間遠心分離した。RNAペレットをTEバッファーに溶解させた。オリゴdTセルロースカラム (ファルマシア社) により、poly(A)⁺RNAを分離した。

【0056】

[実施例3] 3'領域cDNAライブラリーの構築

poly(A)⁺RNAを鋳型として、pUC19を基礎とするベクタープライマー [Norrander J., et al., Gene, 26, 101-106 (1983)] を用いたcDNA合成を行った。このベクタープライマー-DNAは、HincII末端、およびTテールをもつPstI末端を有し、MboI部位 (GATC) でダム・メチル化 (dam-methylated) されていた。第2鎖の合成の後、cDNA配列、およびベクターのlacZ遺伝子内の单一BamHI部位を、それぞれMboIおよびBamHIで切断し、次に、低DNA濃度で環状化およびライゲーションを行った。ライゲーション混合物のうちの一部を大腸菌に形質転換した。得られた形質転換体をランダムに選択し、簡単に加熱することにより個別に溶解させた。cDNA挿入配列を、pUC19クローニングサイトに隣接するプライマー (5'-TGTAAAACGACGGCCA GT-3' / 配列番号: 3 および 5'-ACCATGATTACGCCAAGCTTG-3' / 配列番号: 4) を用いたペアードPCRにより増幅させた。得られた短い二本鎖DNAを、サイクル配列決定

反応に用い、自動配列決定機で解析した。

【0057】

[実施例4] メサンギウム細胞で特異的に発現している遺伝子の単離
 メサンギウム細胞で特異的に発現している遺伝子を同定するため、本発明者は
 、大規模なDNA配列決定およびコンピュータによるデータ処理を行った。このこ
 とにより、様々な異なる細胞および臓器における転写産物を同時に比較すること
 ができた (Y. Yasuda et al., *Kidney International* 53:154-158, 1998; K. Mats
 ubara et al., *Gene*, 135, 265 (1993); K. Okubo et al., *Nat. Gen.* 2, 173 (1992))。ヒト培養メサンギウム細胞の3'領域cDNAライブラリーの大規模DNA配列
 決定を行い、ランダムに選択した1836個のクローンの部分配列を決定した。クロー
 ーンの配列相同性を、相互に比較し、さらにFASTAプログラムを用いてDNAデータ
 バンクGenBankと比較した。様々な臓器および細胞からのmRNAをドットプロット
 解析することにより、メサンギウム細胞で特異的に発現しているクローンが選択
 された。その結果、本発明者のメサンギウム細胞cDNAライブラリーにおいてきわ
 めて高い頻度で検出されるいくつかのクローンが得られた。

【0058】

[実施例5] ヒト・メサンギウム細胞λZIPLox cDNAライブラリーのスクリー
 ニング

実施例2にしたがって調製した全mRNAから、オリゴdTプライマーとランダムプ
 ライマーとを用いてλZIPLox cDNAライブラリーを合成した。ライブラリーの合
 成には市販のλzip lox (Gibco BRL社製、商品名λZIPLox EcoRI Arms) を利用
 した。実施例4で得たメサンギウム細胞cDNAライブラリーで特に高頻度に検出さ
 れる特定のクローンについて、そのインサートをプローブとして、このλZIPLox
 cDNAライブラリーをスクリーニングした。ポジティブクローンについて、挿入
 された遺伝子断片の塩基配列をジデオキシターミネーション法により決定した。

予想される開始コドンATGの位置が、コンセンサス配列と一致し、最長のオ
 ープンリーディングフレーム（「the first ATG rule」を満足する）を与えた。メ
 グー3 cDNAの塩基配列を配列番号：1に、メグー3の推定アミノ酸配列を配列
 番号：2に示す。

【0059】

[実施例6] メサンギウム特異的遺伝子の機能解析（1）

SwissProtデータベースでFASTAプログラムによりアミノ酸ホモロジー検索を行ったところ、高い相同意を持った公知のアミノ酸配列はなく、メグー3が新規なタンパク質であることを確認した。

【0060】

続いてメグー3のアミノ酸配列をモチーフ検索した。検索には、PSORT WWW Server(<http://psort.nibb.ac.jp:8800/>)を利用した。その結果、N末端から数えて500番目以降の領域において、proline rich proteinと呼ばれる多くのタンパク質と良く似たアミノ酸配列が見出された。特に621番目～701番目に至る81アミノ酸残基からなる領域は、プロリンに富み（27.2%）、SH3(Src homology 3)ドメインに結合するproline richペプチド(PRペプチド)のアミノ酸配列(xPx_nPPPFxP)に類似するアミノ酸配列(xPESPPPAXP)を2ヶ所に有する。その他、メグー3には次に示すようなリン酸化酵素によるリン酸化モチーフの存在が確認された。また2つのN-ミリストイル化部位が認められた。更に推測される細胞質局在は52.2%であった。これらの事実は、メグー3がシグナル伝達因子であることを強く示唆する。

カゼイン・カイネースIIリン酸化部位：14

プロテインカイネースCリン酸化部位：9

チロシンカイネースリン酸化部位：1

また、これらの事実に基づいて、733アミノ酸残基からなる上記推定アミノ酸配列がメグー3のアミノ酸配列であることが確認された。このアミノ酸配列からなるタンパク質の、計算上の分子量は約83kDa、pIの理論値は5.72である。

【0061】

[実施例7] メグー3の機能解析（2）－組織分布

メグー3のノーザンプロット解析は、以下のようにして行った。3'領域cDNAライブラリー（実施例3）のポジティブクローンのインサートを、ランダムDNAライピングによってRI標識しプローブとして用いた。試料として以下の細胞から単

離したpoly(A)⁺RNA (2 μg) を、2.2Mホルムアミドを含む1%アガロースゲルで分離し、ニトロセルロースフィルターへ転写した。フィルターをRapid Hyb溶液 (Amersham社, Arlington Heights, IL) 中でハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後に、60°Cで、0.1×SSPE/0.1%SDSという最終ストリンジエンシーで洗浄した。

【0062】

ヒトの複数の初代培養細胞および組織のノーザンプロット、ヒトの癌細胞株のノーザンプロットのための試料は、Clontech (Palo Alto, CA) から購入した。初代培養細胞としては、ヒトメサンギウム細胞、ヒト皮膚纖維芽細胞、ヒト腎皮質上皮細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞、およびヒト平滑筋細胞の初代培養細胞由来の2 μgのpoly(A)⁺RNAを試料とした。ヒトの癌細胞株のノーザンプロットには、前骨髄球白血病HL-60、HeLa細胞S3、慢性骨髓性白血病K-562、リンパ芽球白血病MOLT-4、Burkittリンパ腫Raji、大腸腺癌SW480、肺癌A549、および黒色腫G361由来の2 μgのpoly(A)⁺RNAを試料とした。組織のノーザンプロットには、心、脳、胎盤、肺、肝、骨格筋、腎、および脾由来の2 μgのpoly(A)⁺RNAを試料とした。ハイブリダイゼーションおよび洗浄は上記と同様にして行った。結果は表1-3に示すとおりである。

【0063】

【表1】

初代培養細胞

ヒトメサンギウム細胞	+++
ヒト皮膚纖維芽細胞	++
ヒト腎皮質上皮細胞	++
ヒト臍帯静脈内皮細胞	±
ヒト平滑筋細胞	±

【0064】

【表2】

ヒト癌細胞株

前骨髄球白血病HL-60	-
HeLa細胞S3	+++
慢性骨髓性白血病K-562	+
リンパ芽球白血病MOLT-4	-
Burkittリンパ腫Raji	-
大腸腺癌SW480	+++
肺癌A549	++
黒色腫G361	+

【0065】

【表3】

ヒト組織

心	+
脳	-
胎盤	+++
肺	+
肝	±
骨格筋	±
腎	+
脾	++

【0066】

メグ-3 cDNAプローブを用いたノーザンプロット解析で、メサンギウム培養

細胞に单一の転写産物（約4.0kb）が検出された。ヒトの初代培養細胞においては、メグー3遺伝子がメサンギウム細胞で特に高度に発現していることが特徴的であった。その他の初代培養細胞では、腎皮質上皮細胞や皮膚纖維芽細胞で発現が観察され、ヒトの臍帯静脈内皮細胞や平滑筋細胞においてはわずかな発現が観察された。組織間の比較においては、ヒトの胎盤、次いで肺で高度な発現が観察された。その他に、心、肺、あるいは腎等の組織で発現が観察され、肝と骨格筋においては発現が弱く、脳での発現は検出できなかった。培養癌細胞株においてはHeLa細胞S3と大腸腺癌SW480で強い発現が、また肺癌A549でも発現が見られたが、その他の細胞株では顕著な発現は観察されなかった。

【0067】

【実施例8】 メグー3の機能解析（3）－インサイチュハイブリダイゼーション

インサイチュハイブリダイゼーション（*in situ hybridization*、以下ISHと省略する）により、ヒト正常腎組織で、メグー3 mRNA発現を評価した。ISHは、公知の方法により行った（Kidney Int. 52, 111 (1997)）。ヒト・メグー3 cDNAの404-433位の塩基配列（配列番号：5）をプローブとして用いた。糸球体内で、メグー3転写産物はメサンギウム細胞に局在化していた。シグナルの特異性を評価するため、ハイブリダイゼーションの前にRNaseで組織を前処理すると、メグー3プローブで検出されるシグナルの大部分が除去された。また、100倍過剰の同種または無関係の未標識オリゴヌクレオチドで競合実験を行ったところ、メグー3のプローブに由来するシグナルは、同じ塩基配列を持つオリゴヌクレオチドでは消失したが、非同種オリゴヌクレオチドでは消失しなかった。これらの結果から、配列番号：1に示した塩基配列を持つメグー3遺伝子は、メサンギウム細胞で特異的に発現していることが確認できた。

【0068】

【発明の効果】

本発明により、メサンギウム細胞に高頻度に発現しているDNAと、このDNAがコードするタンパク質等が提供された。これらはメサンギウム細胞に特異的な生理活性に深く関与していると推測され、メサンギウム細胞の同定、メサンギウム細

胞の異常の検出などに有用である。更に、該タンパク質の機能からメサンギウム細胞の機能が明らかになり、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因究明への展開が期待される。また、メサンギウム細胞に関連する疾病的治療、診断等への応用が期待される。

【0069】

具体的には、たとえばメグー3の人為的な調節によって、糸球体腎炎の発症や進展を制御できる可能性がある。あるいはメサンギウム細胞や体液中のメグー3タンパク質やmRNAの定量によって、糸球体腎炎などの腎疾患の診断が可能となることが期待できる。糸球体腎炎ではメサンギウム領域の機能異常が見られ、メサンギウム細胞の増殖、あるいは細胞からのマトリックス基質の産生亢進が起きている。これらの病態にメグー3が関与している可能性は十分に考えられる。

【0070】

本発明によるメグー3は、メサンギウム細胞で高度に発現しているという点では、本発明者が先に報告したメグシンと共通の特徴を備えている。しかしながら本発明によるメグー3はproline richドメインを有する細胞内シグナル伝達系物質である可能性が示唆されるのに対して、メグシンはプロテアーゼインヒビターであるSERPINスーパーファミリーとの相同意を持ったタンパク質である。また本発明によるメグー3が比較的広範囲な組織において発現が観察されている点は、メグシンのメサンギウム細胞に特異的に発現しているという特徴と相違する。したがって本発明によるメグー3は、メサンギウム細胞の機能を支える重要なタンパク質である可能性を持っている。このような重要なタンパク質の存在を明らかにした本発明の意義は大きい。

【0071】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MIYATA, TOSHI

KUROKAWA, KIYOSHI

<120> Meg-3 protein

<130> KRK-103

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3768

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (53)..(2251)

<400> 1

caggaactgg gccagctccg gtcccttcct tttggggctc tcactctgga gg atg ggg 58

Met Gly

1

tgg atg gga gaa aaa acc ggg aag atc ctg acg gag ttc ctc cag ttc 106

Trp Met Gly Glu Lys Thr Gly Lys Ile Leu Thr Glu Phe Leu Gln Phe

5

10

15

特平 1 1 - 1 2 3 5 6 1

tat gaa gac cag tat ggc gtg gct ctc ttc aac agc atg cgc cat gag 154

Tyr Glu Asp Gln Tyr Gly Val Ala Leu Phe Asn Ser Met Arg His Glu

20

25

30

att gag ggc acg ggg ctg ccg cag gcc cag ctg ctc tgg cgc aag gtg 202

Ile Glu Gly Thr Gly Leu Pro Gln Ala Gln Leu Leu Trp Arg Lys Val

35

40

45

50

cca ctg gac gag cgc atc gtc ttc tcg ggg aac ctc ttc cag cac cag 250

Pro Leu Asp Glu Arg Ile Val Phe Ser Gly Asn Leu Phe Gln His Gln

55

60

65

gag gac agc aag aag tgg aga aac cgc ttc agc ctc gtg ccc cac aac 298

Glu Asp Ser Lys Lys Trp Arg Asn Arg Phe Ser Leu Val Pro His Asn

70

75

80

tac ggg ctg gtg ctc tac gaa aac aaa gcg gcc tat gag cgg cag gtc 346

Tyr Gly Leu Val Leu Tyr Glu Asn Lys Ala Ala Tyr Glu Arg Gln Val

85

90

95

cca cca cga gcc gtc atc aac agt gca ggc tac aaa atc ctc acg tcc 394

Pro Pro Arg Ala Val Ile Asn Ser Ala Gly Tyr Lys Ile Leu Thr Ser

100

105

110

gtg gac caa tac ctg gag ctc att ggc aac tcc tta cca ggg acc acg 442

Val Asp Gln Tyr Leu Glu Leu Ile Gly Asn Ser Leu Pro Gly Thr Thr

115

120

125

130

gca aag tcg ggc agt gcc ccc atc ctc aag tgc ccc aca cag ttc ccg 490

Ala Lys Ser Gly Ser Ala Pro Ile Leu Lys Cys Pro Thr Gln Phe Pro

135

140

145

ctc atc ctc tgg cat cct tat gcg cgt cac tac tac ttc tgc atg atg 538

Leu Ile Leu Trp His Pro Tyr Ala Arg His Tyr Tyr Phe Cys Met Met

150

155

160

aca gaa gcc gag cag gac aag tgg cag gct gtg ctg cag gac tgc atc 586

Thr Glu Ala Glu Glu Gln Asp Lys Trp Gln Ala Val Leu Gln Asp Cys Ile

165

170

175

cgg cac tgc aac aat gga atc cct gag gac tcc aag gta gag ggc cct 634

Arg His Cys Asn Asn Gly Ile Pro Glu Asp Ser Lys Val Glu Gly Pro

180

185

190

gcg ttc aca gat gcc atc cgc atg tac cga cag tcc aag gag ctg tac 682

Ala Phe Thr Asp Ala Ile Arg Met Tyr Arg Gln Ser Lys Glu Leu Tyr

195

200

205

210

ggc acc tgg gag atg ctg tgt ggg aac gag gtg cag atc ctg agc aac 730

Gly Thr Trp Glu Met Leu Cys Gly Asn Glu Val Gln Ile Leu Ser Asn

215

220

225

ctg gtg atg gag gag ctg ggc cct gag ctg aag gca gag ctc ggc ccg 778

Leu Val Met Glu Glu Leu Gly Pro Glu Leu Lys Ala Glu Leu Gly Pro

230

235

240

cgg ctg aag ggg aaa ccg cag gag cgg cag cgg cag tgg atc cag atc 826

Arg Leu Lys Gly Lys Pro Gln Glu Arg Gln Arg Gln Trp Ile Gln Ile

245	250	255	
tcg gac gcc gtg tac cac atg gtg tac gag cag gcc aag gcg cgc ttc 874 Ser Asp Ala Val Tyr His Met Val Tyr Glu Gln Ala Lys Ala Arg Phe			
260	265	270	
gag gag gtg ctg tcc aag gtg cag cag gtg cag ccg gcc atg cag gcc 922 Glu Glu Val Leu Ser Lys Val Gln Gln Val Gln Pro Ala Met Gln Ala			
275	280	285	290
gtc atc cga act gac atg gac caa att atc acc tcc aag gag ctc ctt 970 Val Ile Arg Thr Asp Met Asp Gln Ile Ile Thr Ser Lys Glu Leu Leu			
295	300	305	
gcc agc aag atc cga gcc ttc atc ctc ccc aag gca gag gtg tgc gtg 1018 Ala Ser Lys Ile Arg Ala Phe Ile Leu Pro Lys Ala Glu Val Cys Val			
310	315	320	
cgg aac cat gtc cag ccc tac atc cca tcc atc ctg gag gcc ctg atg 1066 Arg Asn His Val Gln Pro Tyr Ile Pro Ser Ile Leu Glu Ala Leu Met			
325	330	335	
gtc ccc acc agc cag ggc ttc act gag gtg cga gat gtc ttc ttc aag 1114 Val Pro Thr Ser Gln Gly Phe Thr Glu Val Arg Asp Val Phe Phe Lys			
340	345	350	
gag gtc acg gac atg aac ctg aac gtc atc aac gag ggc ggc att gac 1162 Glu Val Thr Asp Met Asn Leu Asn Val Ile Asn Glu Gly Gly Ile Asp			
355	360	365	370

aag ctg ggc gag tac atg gag aag ctg tcc cgg ctg gcg tac cac ccc 1210

Lys Leu Gly Glu Tyr Met Glu Lys Leu Ser Arg Leu Ala Tyr His Pro

375

380

385

ctg aag atg cag agc tgc tat gag aag atg gag tcg ctg cga ctg gac 1258

Leu Lys Met Gln Ser Cys Tyr Glu Lys Met Glu Ser Leu Arg Leu Asp

390

395

400

ggg ctg cag cag cga ttt gat gtg tcc agc acg tcc gtg ttc aag cag 1306

Gly Leu Gln Gln Arg Phe Asp Val Ser Ser Thr Ser Val Phe Lys Gln

405

410

415

cga gcc cag atc cac atg cgg gag caa atg gac aat gcc gtg tat acg 1354

Arg Ala Gln Ile His Met Arg Glu Gln Met Asp Asn Ala Val Tyr Thr

420

425

430

ttc gag acc ctc ctg cac cag gag ctg ggg aag ggg ccc acc aag gag 1402

Phe Glu Thr Leu Leu His Gln Glu Leu Gly Lys Gly Pro Thr Lys Glu

435

440

445

450

gag ctg tgc aag tcc atc cag cgg gtc ctg gag cgg gtg ctg aaa aaa 1450

Glu Leu Cys Lys Ser Ile Gln Arg Val Leu Glu Arg Val Leu Lys Lys

455

460

465

tac gac tac gac agc agc tct gtg cgg aag agg ttc ttc cgg gag gcg 1498

Tyr Asp Tyr Asp Ser Ser Val Arg Lys Arg Phe Phe Arg Glu Ala

470

475

480

特平 1 1 - 1 2 3 5 6 1

ctg ctg cag atc agc atc ccg ttc ctg ctc aag aag ctg gcc cct acc 1546

Leu Leu Gln Ile Ser Ile Pro Phe Leu Leu Lys Lys Leu Ala Pro Thr

485

490

495

tgc aag tcg gag ctg ccc cgg ttc cag gag ctg atc ttc gag gac ttt 1594

Cys Lys Ser Glu Leu Pro Arg Phe Gln Glu Leu Ile Phe Glu Asp Phe

500

505

510

gcc agg ttc atc ctg gtg gaa aac acg tac gag gag gtg gtg ctg cag 1642

Ala Arg Phe Ile Leu Val Glu Asn Thr Tyr Glu Glu Val Val Leu Gln

515

520

525

530

acc gtc atg aag gac atc ctg cag gct gtg aag gag gcc gcg gtg cag 1690

Thr Val Met Lys Asp Ile Leu Gln Ala Val Lys Glu Ala Ala Val Gln

535

540

545

agg aag cac aac ctc tac cgg gac agc atg gtc atg cac aac agc gac 1738

Arg Lys His Asn Leu Tyr Arg Asp Ser Met Val Met His Asn Ser Asp

550

555

560

ccc aac ctg cac ctg ctg gcc gag ggc gcc ccc atc gac tgg ggc gag 1786

Pro Asn Leu His Leu Ala Glu Gly Ala Pro Ile Asp Trp Gly Glu

565

570

575

gag tac agc aac agc ggc ggg ggc agc ccc agc ccc agc acc acc ccc 1834

Glu Tyr Ser Asn Ser Gly Gly Gly Ser Pro Ser Pro Ser Thr Pro

580

585

590

gag tca gcc acc ctc tcg gaa aag cga cgg cgc gcc aag cag gtg gtc 1882

Glu Ser Ala Thr Leu Ser Glu Lys Arg Arg Arg Ala Lys Gln Val Val

595 600 605 610

tct gtg gtc cag gat gag gag gtg ggg ctg ccc ttt gag gct agc cct 1930

Ser Val Val Gln Asp Glu Glu Val Gly Leu Pro Phe Glu Ala Ser Pro

615 620 625

gag tca cca cca cct gcg tcc ccg gac ggt gtc act gag atc cga ggc 1978

Glu Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Asp Gly Val Thr Glu Ile Arg Gly

630 635 640

ctg ctg gcc caa ggt ctg cgg cct gag agc ccc cca cca gcc ggc ccc 2026

Leu Leu Ala Gln Gly Leu Arg Pro Glu Ser Pro Pro Pro Ala Gly Pro

645 650 655

ctg ctc aac ggg gcc ccc gct ggg gag agt ccc cag cct aag gcc gcc 2074

Leu Leu Asn Gly Ala Pro Ala Gly Glu Ser Pro Gln Pro Lys Ala Ala

660 665 670

ccc gag gcc tcc tcg ccg cct gcc tca ccc ctc cag cat ctc ctg cct 2122

Pro Glu Ala Ser Ser Pro Pro Ala Ser Pro Leu Gln His Leu Leu Pro

675 680 685 690

gga aag gct gtg gac ctt ggg ccc ccc aag ccc agc gac cag gag act 2170

Gly Lys Ala Val Asp Leu Gly Pro Pro Lys Pro Ser Asp Gln Glu Thr

695 700 705

gga gag cag gtg tcc agc ccc agc agc cac ccc gcc ctc cac acc acc 2218

Gly Glu Gln Val Ser Ser Pro Ser Ser His Pro Ala Leu His Thr Thr

特平 1 1 - 1 2 3 5 6 1

710

715

720

acc gag gac agt gca ggg gtg cag act gag ttc taggccagtg ggtccctgac 2271
Thr Glu Asp Ser Ala Gly Val Gln Thr Glu Phe

725

730

tgctgcacat ggcacaggcc gttcccttcc ggacccaggc aggctcagct ctggggaggg 2331

caccctggtc tgtgccttgt gggtgagggc gggcagggc tgtgtggcac cgccagggag 2391

cgggccccacc tgagtcactt tattgggttc agtcaacact ttcttgctcc ctgtttctc 2451

ttctgtggga tgatctcaga tgcagggct ggttttgggg tttcctgct tgtgccaagg 2511

gctggacact gctgggggc tggaaagccc ctcccttcct gtccttctgt ggcctccatc 2571

ccctcatggg tgctgccatc ctccctggag agagggaggt gaaagctggt gtgagccag 2631

tgggttcccg cccactcacc caggagctgg ctgggccagg accggagag ggagcaactgc 2691

tgcctccctg gccctgtcc ttccgcagtt aggggtggac cgagcctcgc ttccccact 2751

gttctggagg gaaggggaag gagggggct tcaggctgga gccaggctgg gggtgctgg 2811

tggagagatg agattaggg ggtgcctcat ggggtggca ggcctgggt gaaatgagaa 2871

aggcccagaa cgtgcaggc tgcggaggg aagtgtcctg agtgaaggag gggacccat 2931

cctggggatg ctgggagtgta gtgagtgaga tggctgagtg agggttatgg ggagcctgag 2991

gttttatggg cctgtgtatc cccttctccc ggccccagcc tgcctccctc ctgcccgcct 3051

ggccccacagg tctccctctg gtccctgtcc ctctggtggt tggggatgga gcggcagcaa 3111

ggggtgtaat ggggctgggt tctgtcttct acaggccacc ccgaggcct cagtggttgc 3171

ctggggagcc ggacggggct cctgaggggt acaggttggg tggccctcc ctgagggct 3231

ggggtcaggc tttggcctct gctgcctctc agtcaccaag tcaccccttct ctgaaaatcc 3291

agtcccttct ttggatgtcc ttgtgagtca ctctggcct ggctgtcgct cctcctcagc 3351

ttcttgttcc tgggacaagg gtcaagccag gatgggccc ggcntggat cccccacccc 3411

aggacccac aggccccctc ccctignign ttcgggggg cagggcagaa atggactcct 3471

tttgggtccc cgaggtgggg tcccctccca gccctgcattt ctcgtgccct tagaccgtct 3531

ccccagagga gggccttga cccacaggaa gtgtggtggc gcctggcaat cagggacccc 3591

cagctgccgc agccctgggtt tttggcgcat cttttccctc ttgtccgaa gatttgcgcc 3651

tttagtgct tttaggggt tcccatcatc cctccctgat attgtattga aaatattatg 3711

cacactgttc atgctttac taatcaataa acgctttatt taaaaaaaaaaaaaaa 3768

特平 1 1 — 1 2 3 5 6 1

<211> 733

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Trp Met Gly Glu Lys Thr Gly Lys Ile Leu Thr Glu Phe Leu

1

5

10

15

Gln Phe Tyr Glu Asp Gln Tyr Gly Val Ala Leu Phe Asn Ser Met Arg

20

25

30

His Glu Ile Glu Gly Thr Gly Leu Pro Gln Ala Gln Leu Leu Trp Arg

35

40

45

Lys Val Pro Leu Asp Glu Arg Ile Val Phe Ser Gly Asn Leu Phe Gln

50

55

60

His Gln Glu Asp Ser Lys Lys Trp Arg Asn Arg Phe Ser Leu Val Pro

65

70

75

80

His Asn Tyr Gly Leu Val Leu Tyr Glu Asn Lys Ala Ala Tyr Glu Arg

85

90

95

Gln Val Pro Pro Arg Ala Val Ile Asn Ser Ala Gly Tyr Lys Ile Leu

100

105

110

Thr Ser Val Asp Gln Tyr Leu Glu Leu Ile Gly Asn Ser Leu Pro Gly

115

120

125

Thr Thr Ala Lys Ser Gly Ser Ala Pro Ile Leu Lys Cys Pro Thr Gln

130 135 140

Phe Pro Leu Ile Leu Trp His Pro Tyr Ala Arg His Tyr Tyr Phe Cys

145 150 155 160

Met Met Thr Glu Ala Glu Gln Asp Lys Trp Gln Ala Val Leu Gln Asp

165 170 175

Cys Ile Arg His Cys Asn Asn Gly Ile Pro Glu Asp Ser Lys Val Glu

180 185 190

Gly Pro Ala Phe Thr Asp Ala Ile Arg Met Tyr Arg Gln Ser Lys Glu

195 200 205

Leu Tyr Gly Thr Trp Glu Met Leu Cys Gly Asn Glu Val Gln Ile Leu

210 215 220

Ser Asn Leu Val Met Glu Glu Leu Gly Pro Glu Leu Lys Ala Glu Leu

225 230 235 240

Gly Pro Arg Leu Lys Gly Lys Pro Gln Glu Arg Gln Arg Gln Trp Ile

245 250 255

Gln Ile Ser Asp Ala Val Tyr His Met Val Tyr Glu Gln Ala Lys Ala

260 265 270

Arg Phe Glu Glu Val Leu Ser Lys Val Gln Gln Val Gln Pro Ala Met

275 280 285

特平 1 1 - 1 2 3 5 6 1

Gln Ala Val Ile Arg Thr Asp Met Asp Gln Ile Ile Thr Ser Lys Glu

290 295 300

Leu Leu Ala Ser Lys Ile Arg Ala Phe Ile Leu Pro Lys Ala Glu Val

305 310 315 320

Cys Val Arg Asn His Val Gln Pro Tyr Ile Pro Ser Ile Leu Glu Ala

325 330 335

Leu Met Val Pro Thr Ser Gln Gly Phe Thr Glu Val Arg Asp Val Phe

340 345 350

Phe Lys Glu Val Thr Asp Met Asn Leu Asn Val Ile Asn Glu Gly Gly

355 360 365

Ile Asp Lys Leu Gly Glu Tyr Met Glu Lys Leu Ser Arg Leu Ala Tyr

370 375 380

His Pro Leu Lys Met Gln Ser Cys Tyr Glu Lys Met Glu Ser Leu Arg

385 390 395 400

Leu Asp Gly Leu Gln Gln Arg Phe Asp Val Ser Ser Thr Ser Val Phe

405 410 415

Lys Gln Arg Ala Gln Ile His Met Arg Glu Gln Met Asp Asn Ala Val

420 425 430

Tyr Thr Phe Glu Thr Leu Leu His Gln Glu Leu Gly Lys Gly Pro Thr

435

440

445

Lys Glu Glu Leu Cys Lys Ser Ile Gln Arg Val Leu Glu Arg Val Leu

450

455

460

Lys Lys Tyr Asp Tyr Asp Ser Ser Ser Val Arg Lys Arg Phe Phe Arg

465

470

475

480

Glu Ala Leu Leu Gln Ile Ser Ile Pro Phe Leu Leu Lys Lys Leu Ala

485

490

495

Pro Thr Cys Lys Ser Glu Leu Pro Arg Phe Gln Glu Leu Ile Phe Glu

500

505

510

Asp Phe Ala Arg Phe Ile Leu Val Glu Asn Thr Tyr Glu Glu Val Val

515

520

525

Leu Gln Thr Val Met Lys Asp Ile Leu Gln Ala Val Lys Glu Ala Ala

530

535

540

Val Gln Arg Lys His Asn Leu Tyr Arg Asp Ser Met Val Met His Asn

545

550

555

560

Ser Asp Pro Asn Leu His Leu Leu Ala Glu Gly Ala Pro Ile Asp Trp

565

570

575

Gly Glu Glu Tyr Ser Asn Ser Gly Gly Gly Ser Pro Ser Pro Ser

580

585

590

特平 1 1 — 1 2 3 5 6 1

Thr Pro Glu Ser Ala Thr Leu Ser Glu Lys Arg Arg Arg Ala Lys Gln

595 600 605

Val Val Ser Val Val Gln Asp Glu Glu Val Gly Leu Pro Phe Glu Ala

610 615 620

Ser Pro Glu Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Asp Gly Val Thr Glu Ile

625 630 635 640

Arg Gly Leu Leu Ala Gln Gly Leu Arg Pro Glu Ser Pro Pro Pro Ala

645 650 655

Gly Pro Leu Leu Asn Gly Ala Pro Ala Gly Glu Ser Pro Gln Pro Lys

660 665 670

Ala Ala Pro Glu Ala Ser Ser Pro Pro Ala Ser Pro Leu Gln His Leu

675 680 685

Leu Pro Gly Lys Ala Val Asp Leu Gly Pro Pro Lys Pro Ser Asp Gln

690 695 700

Glu Thr Gly Glu Gln Val Ser Ser Pro Ser Ser His Pro Ala Leu His

705 710 715 720

Thr Thr Thr Glu Asp Ser Ala Gly Val Gln Thr Glu Phe

725 730

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

tgtaaaacga cggccagt

18

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

accatgatta cgccaagctt g

21

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

特平 1 1 - 1 2 3 5 6 1

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthrsized Probe Sequence

<400> 5

tacctggagc tcattggcaa ctccttacca

30

【書類名】要約書

【要約】

【課題】

本発明は、メサンギウム細胞で高頻度に発現される遺伝子を単離することを課題とする。

【解決手段】

本発明は、メサンギウム細胞で高頻度に発現しているDNA、そしてこのDNAがコードするタンパク質（メグー3）を提供する。これらは、メサンギウム細胞の同定、メサンギウム細胞の異常の検出などに有用である。更に、該タンパク質の機能からメサンギウム細胞の機能が明らかになり、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因究明への展開が期待される。また、メサンギウム細胞に関連する疾病的治療、診断等への応用が期待される。

【選択図】 なし

特平11-123561

出願人履歴情報

識別番号 [597142376]

1. 変更年月日 1999年 2月10日

[変更理由] 住所変更

住 所 神奈川県伊勢原市東成瀬4-2-3-101

氏 名 宮田 敏男

出願人履歴情報

識別番号 [597142387]

1. 変更年月日 1997年 9月22日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都新宿区市谷柳町49市ヶ谷ヒルズ401

氏 名 黒川 清

